

University of Groningen

Impairment of mitochondrial protein synthesis, diogenetic and bioenergetic aspects

Jong, Luitzen de

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1979

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Jong, L. D. (1979). Impairment of mitochondrial protein synthesis, diogenetic and bioenergetic aspects. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

transport and energy
E. and Slater, E.C.,

sterdam.

t. Amst. Proc. Ser. C

ductive and photosyn-

978) Proc. Natl.

Sigrist-Nelson, K.
, 2375-2378.

Acta 345, 245-260.

ker, L. (1969) Arch.

ci. USA 71, 2118-2122.
53, 7262-7268.

SAMENVATTING

In vrijwel alle dierlijke en plantaardige cellen komen mitochondriën voor. Mitochondriën zijn structuren die omgeven zijn door een dubbele membraan en die de energievoorziening van de cel verzorgen. Een cel kan het dan ook niet zonder goed functionerende mitochondriën stellen. Mitochondriën kunnen zelf een aantal eiwitten maken. Deze eiwitsynthese wordt specifiek geremd door een aantal stoffen die ook de eiwitsynthese in bacteriën remmen, maar die de eiwitsynthese in de cel zelf ongemoeid laten. Dergelijke stoffen zijn bijvoorbeeld tetracycline, chlooramfenicol en thiamfenicol. Al deze antibiotica vinden klinische toepassing ter bestrijding of preventie van infecties. In Hoofdstuk II is beschreven in hoeverre behandeling van ratten met thiamfenicol invloed heeft op het functioneren van mitochondriën. Deze onderzoeken zijn gedaan in het weefsel dat de darmwand bekleedt, het darmepitheel, omdat juist dit weefsel voortdurend en met hoge snelheid wordt vernieuwd en dus een actieve eiwitsynthese heeft.

Bij behandeling van ratten met thiamfenicol, in een dosis van 125 mg per kg lichaamsgewicht per dag, daalt na 2½ dag het gehalte aan cytochroom *aa*₃ en cytochroom *b* in het epitheel van de dunne darm tot circa 25% van de normale waarden. Tevens wordt de mitochondriale ATPase activiteit ongevoelig voor remming door oligomycine. Het is bekend dat in de lagere eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* en *Neurospora crassa* een of meer subeenheden van de cytochromen *aa*₃ en *b* en van het mitochondriale ATPase complex in de mitochondriën worden gemaakt en zeer waarschijnlijk worden gecodeerd door het mitochondriale DNA. De proeven, tot nu toe beschreven, wijzen erop, tezamen met die van andere onderzoekers, dat ook in zoogdieren een of meer subeenheden van de betreffende binnenmembraaneiwitten door het mitochondriale eiwitsynthetiserend apparaat worden gemaakt. De thiamfenicolbehandeling interfereert niet met de synthese van eiwitten die in het cytoplasma worden gemaakt en vervolgens in het mitochondriale binnenmembraan worden ingebouwd, zoals cytochroom *c* of door het binnenmembraan heen getransporteerd worden naar de matrix, zoals glutamaatdehydrogenase (Hoofdstuk II).

Experimenten met geïsoleerde mitochondriën uit het darmepitheel van behandelde dieren wezen uit dat de ademhaling in aanwezigheid van ADP (state-3 ademhaling) 55% is gedaald met succinaat en 40% met pyruvaat plus L-malaat als substraten, vergeleken met de waarden van controle dieren. De remming van de state-3 ademhaling door oplopende concentraties oligomycine heeft een sigmoïdaal verloop in controle mitochondriën, terwijl in geïsoleerde mitochondriën uit ratten, die behandeld zijn met thiamfenicol, dit verloop lineair is. De ademhalingscontrole indices en P:O ratio's zijn vergelijkbaar in de twee groepen dieren. Bij een hogere dosis thiamfenicol (500 mg per kg lichaamsgewicht per dag) daalt echter ook de P:O ratio met succinaat als substraat aanzienlijk (32%). De ontkoppelde ademhaling, geïnduceerd door dinitrofenol, is met 35% afgenomen met succinaat als substraat, terwijl de succinaat cytochroom *c* reductase activiteit onveranderd blijft. Er werd geen remming van de ontkoppelde ademhaling met pyruvaat plus L-malaat als substraten waargenomen. De $^{32}\text{P}_i$ -ATP uitwisselingsactiviteit in de mitochondriën van de behandelde dieren is met 75% verminderd. Deze activiteit wordt volledig geremd door oligomycine. Dus alleen het resterende oligomycinegevoelige ATPase is in staat tot ATP-synthese. De waarneming, dat de state-3 ademhaling is geremd in mitochondriën van ratten die behandeld zijn met thiamfenicol, kan worden verklaard door aan te nemen dat het oligomycinegevoelige ATPase het snelheidsbeperkende enzym is geworden. In de geremde ontkoppelde ademhaling, met het snel geoxideerde succinaat als substraat, is waarschijnlijk het, sterk in activiteit verminderde, cytochroom *c* oxidase snelheidsbeperkend.

Teneinde na te gaan of de geremde state-3 ademhaling in geïsoleerde mitochondriën gepaard gaat met functieverlies van het orgaan, werd de ademhaling in geïsoleerde cellen uit het epitheel van de dunne darm gemeten, alsmede het actief transport van galactose *in vitro* (everted sacs) en *in vivo* (luminale perfusie). Het gemiddelde van de QO_2 waarden in de epitheelcellen van ratten die behandeld zijn met thiamfenicol is 15% lager dan dat in cellen uit controle dieren. Een significant verschil kon echter niet worden aangetoond. In aanwezigheid van het substraat glutamine neemt de ademhaling met circa 30% toe. Ook onder deze condities waren de verschillen ongeveer 15%. Behandeling van de ratten met thiamfenicol heeft geen effect op het galactosetransport *in vitro*, terwijl bij luminale perfusie alleen met een hypertoon perfusiemedium de galactose- en wateropname door de dunne darm in geringe mate is geremd. Kennelijk is de reserve zo groot dat bij 75% daling van het gehalte aan cytochroom *aa*₃, cytochroom *b* en ATP-synthetase het orgaan vrij-

wel normaal kan functioneren, althans onder de experimentele condities (Hoofdstuk III).

Zoals opgemerkt ontstaat bij geremde mitochondriale eiwitsynthese een deficient ATPase complex dat gebonden is aan het mitochondriale binnenmembraan, niet meer in staat is tot ATP synthese, maar wel tot ATP hydrolyse.

Teneinde inzicht krijgen in de aard en functie van de subeenheden van het enzymcomplex die in de mitochondriën worden gemaakt, werd het deficiënte ATPase complex aan een nadere studie onderworpen. Door de geringe hoeveelheid materiaal die het epitheel van de dunne darm oplevert is dit weefsel als bron voor het, door thiamfenicol geïnduceerde, deficiënte ATPase complex minder geschikt. Daarom werd als systeem de regenererende lever gekozen.

In Hoofdstuk II is beschreven dat de enzymactiviteit van het deficiënte ATPase complex niet meer wordt beïnvloed door remmers die aangrijpen op membraangedeelte (F_0) van het enzym, zoals oligomycine en dicyclohexylcarbodiimide (DCCD). Met behulp van reconstitutie-experimenten kon worden aangetoond dat het ATPase gedeelte van het enzym (F_1) met dezelfde affiniteit bindt aan het normale F_0 - en het deficiënte F_0 -gedeelte (Hoofdstuk IV). Deze waarneming bood de mogelijkheid het door thiamfenicol geïnduceerde deficiënte ATPase-complex en het normale oligomycinegevoelige complex met een identieke zuiveringsmethode te isoleren. Met behulp van polyacrylamide gelelectroforese in aanwezigheid van natriumdodecylsulfaat konden 12 verschillende eiwitbanden met molecuulgewichten variërend van 53 000 tot 6 à 7 000 worden geïdentificeerd in het ATPase complex. In het deficiënte complex ontbreken 3 subeenheden met molecuulgewichten van resp. 25 000 (band 6), 22 000 (band 7) en 9 000 (band 10). Dit kon worden aangetoond met *in vivo* labelingsexperimenten. De *in vivo* synthese van de andere subeenheden wordt niet geremd door thiamfenicol. Dit houdt in dat deze subeenheden in het cytoplasma worden gesynthetiseerd en vandaar tenslotte in het mitochondriale binnenmembraan terechtkomen (Hoofdstuk IV).

The synthese van de DCCD-bindende subeenheid, die in *Saccharomyces cerevisiae* in de mitochondriën en in *Neurospora crassa* in het cytoplasma wordt gemaakt, vindt in de rat plaats in het cytoplasma. Deze conclusie is gebaseerd op de waarneming dat radioactief DCCD, na incubatie met het geïsoleerde ATPase complex, geassocieerd is met de 7 000 M_r band 11 en vooral met de 14 000 M_r band 8, die waarschijnlijk de dimeren van het DCCD-bindende eiwit bevat. Zowel band 11 als band 8 worden normaal gesynthetiseerd en ge-

assembleerd wanneer de mitochondriale eiwitsynthese geremd is door thiamfenicol. Tevens binden submitochondriale partikels, geïsoleerd uit de regenererende lever van ratten die behandeld zijn met thiamfenicol, teminste evenveel DCCD als controle submitochondriale particles, ondanks de verhoogde resistentie van de ATPase tegen DCCD. Ook oligomycine, dat mogelijk aan dezelfde subeenheid bindt als DCCD, wordt per eenheid totale ATPase activiteit in dezelfde mate gebonden aan geïsoleerde mitochondriën uit het dunne darm-epitheel van controle- en met thiamfenicol behandelde dieren. Dus de ongevoeligheid van het deficiente ATPase-complex voor remming door oligomycine en DCCD wordt niet veroorzaakt door het ontbreken van bindingseiwitten voor deze remmers, maar door de afwezigheid van één of meer subeenheden, die op andere wijze betrokken zijn bij de DCCD- en oligomycinegevoeligheid van het ATPase-complex (Hoofdstuk V).

Teneinde na te gaan of de subeenheden 6, 7 en 10 (Hoofdstuk IV) in de mitochondriën worden gemaakt, werden de *in vitro*, door geïsoleerde mitochondriën gesynthetiseerde, radioactief gelabelde polypeptiden op polyacrylamide gels in aanwezigheid van natriumdodecylsulfaat gescheiden en zichtbaar gemaakt middels autoradiografie. Minstens vijf polypeptiden, met moleculgewichten variërend van 42 000 tot 19 000, genummerd I-V, konden worden geïdentificeerd. Van de polypeptiden III en IV zijn de moleculgewichten identiek aan die van de subeenheden in de banden 6 resp. 7. Polypeptide IV is bovendien verrijkt in een gezuiverde ATPase fractie; polypeptide III wordt *in vitro* niet in het ATPase complex geassembleerd. Geconcludeerd wordt dat de mitochondriën tenminste één en zeer waarschijnlijk twee subeenheden (M_r resp. 22 000 en 25 000) van het ATPase complex synthetiseren en dat de 3e ontbrekende subeenheid in het, door thiamfenicol geïnduceerde, deficiente complex in het cytoplasma wordt gemaakt maar niet wordt geassembleerd onder deze condities in het ATPase complex. Band 7 bevat waarschijnlijk 2 subeenheden: één waarvan de synthese in de mitochondriën plaatsvindt en één (het oligomycin sensitivity conferring protein (OSCP)) die in het cytoplasma wordt gesynthetiseerd (Hoofdstuk VI).

De resultaten van de experimenten tezamen worden in Hoofdstuk VII bediscussieerd in het licht van Mitchell's chemiosmotische theorie van de oxidatieve fosforylering. Tevens wordt stil gestaan bij de vraag waarom cellen een kennelijke overmaat aan ademhalingscomponenten bezitten. De aandacht wordt gevestigd op het feit dat bepaalde processen in mitochondriën aan oscillaties onderhevig zijn.